



# GynTect®

Základní UDI-DI: 426076785GYNTECTYM

## Návodem k použití

**REF**

GT003-06

GT003-10



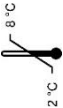
6 vzorků

10 vzorků

**UDI-DI**

4260767851017

4260767851116



Před použitím testu GynTect® si pečlivě přečtěte tyto pokyny. Postupujte přesně podle nich, aby byly dosažené výsledky spolehlivé.

GynTect® je *in vitro* diagnostický kit určený pro kvalitativní detekci epigenetických markerů v bisulfiticky-konvertované DNA z cervikálních vzorků žen s pozitivním výsledkem HPV testu nebo s nejasným nálezem Papova stěru. Pozitivní výsledek testu GynTect® souvisí s přítomností cervikální intraepiteliální neoplasie nebo rakovinou děložního krčku.

Pouze pro použití k diagnostice *in vitro* kvalifikovaným personálem.

Revize 6 (srpen 2024)  
Překlad vydán v říjnu 2024



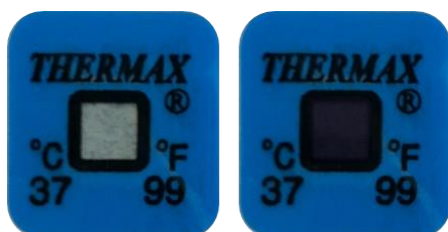
oncnostics GmbH  
Löbstedter Straße 41 • 07749 Jena • Německo  
Telefon: +49 (0) 3641 5548500  
contact@oncnostics.com • www.oncnostics.com





## DODÁNÍ A SKLADOVÁNÍ

GynTect® Kit se přepravuje při pokojové teplotě. Dodržení meze teploty je monitorováno teplotním indikátorem. Barvu tohoto indikátoru zkontrolujte ihned po obdržení soupravy (viz Obrázek 1) a ověřte také, zda jsou sekundární balení, uzávěr a primární balení nepoškozené. Soupravu je nutno ihned po převzetí ochladit na 2 - 8 °C a uchovávat tak, aby byla chráněna před světlem. Při dodržení přepravních a skladovacích podmínek je GynTect® Kit a její součásti možné používat až do uvedeného data použitelnosti. Za těchto skladovacích podmínek platí datum použitelnosti i pro otevřená činidla.



Obrázek 1 Kontrola teploty během přepravy

Tepelný indikátor v GynTect® Kit umožňuje sledování teploty během přepravy. Jasně stříbrný čtvereček ve středu indikátoru signalizuje, že teplota během přepravy nepřekročila povolenou hodnotu. Pokud je ale čtvereček černý, povolená teplota byla během dopravy překročena. V takovém případě funkci GynTect® Kit nelze zaručit. Kontaktujte společnost oncgnostics GmbH.

## OBSAH

1.	Určeným účelem .....	5
2.	Klinický význam .....	5
3.	Principu zkušební metody .....	5
4.	Uspořádání stanovení GynTect® .....	7
4.1.	Rozložení GynTect® Strips .....	7
4.2.	Kontroly .....	7
4.2.1.	Kontrola kvality konverze hydrogensířičitanem (ACHE) .....	7
4.2.2.	Kontrola kvality metylace (IDS-M) .....	7
4.2.3.	Pozitivní kontrola .....	7
4.2.4.	Negativní kontrola .....	7
5.	Referenčních materiálů .....	8
6.	Obsah soupravy .....	8
7.	Spotřební materiál a vybavení (není součástí soupravy) .....	8
8.	Uchovávaní a doba použitelnosti .....	10
9.	Bezpečnostní pokyny .....	10
9.1.	Obecné informace .....	10
9.2.	Oddělení prostor .....	11
9.3.	Prevence kontaminace .....	11
9.4.	Pokyny k manipulaci .....	12
10.	Likvidace .....	12
11.	Postup stanovení GynTect® .....	13
11.1.	Časový rozvrh pracovního postupu .....	13
11.2.	Odběr vzorků .....	13
11.3.	Příprava vzorku .....	14
11.4.	Ošetření vzorků hydrogensířičitanem .....	14

11.4.1.	Konverze DNA hydrogensířičitanem .....	14
11.4.2.	Purifikace konvertované DNA .....	15
11.5.	PCR .....	17
11.5.1.	Příprava a pipetování PCR reakce.....	17
11.5.2.	Provádění PCR na cobas z 480 Analyzer .....	19
11.5.3.	Provádění PCR na CFX96 Real-Time PCR Detection System .....	22
11.6.	Vyhodnocení a interpretace dat PCR.....	25
12.	Parametry stanovení GynTect® .....	28
12.1.	Analytická parametry stanovení GynTect® .....	28
12.1.1.	Analytická citlivost – detekce metylované DNA .....	28
12.1.2.	Analytická specifita – detekce nemetylované DNA.....	29
12.2.	Přesnost.....	30
12.2.1.	Opakovatelnost .....	30
12.2.2.	Reprodukovatelnost.....	30
12.3.	Robustnost.....	30
12.4.	Parametry stanovení GynTect® při klinickém použití.....	31
13.	Meze tohoto postupu.....	32
14.	Literatura .....	32
15.	Právní odpovědnost .....	33
16.	Dotazy a problémy .....	33
17.	Další poznámky.....	34
18.	Význam symbolů.....	34
19.	Seznam změn .....	35
20.	Zkrácený protokol.....	35

## 1. URČENÝM ÚČELEM

GynTect® je *in vitro* diagnostický kit určený pro kvalitativní detekci epigenetických markerů v bisulfiticky-konvertované DNA z cervikálních vzorků žen s pozitivním výsledkem HPV testu nebo s nejasným nálezem Papova stěru. Pozitivní výsledek testu GynTect® souvisí s přítomností cervikální intraepiteliální neoplasie nebo rakovinou děložního krčku.

Souprava GynTect® je určena pro použití kvalifikovaným personálem obeznámeným s technikami molekulární biologie.

## 2. KLINICKÝ VÝZNAM

Karcinom děložního čípku je čtvrtým nejčastějším typem nádoru u žen na celém světě; každý rok je diagnostikováno > 600 000 nových případů [1]. U téměř všech případů karcinomu děložního čípku je zjištěna přetrvávající infekce vysoce rizikovým kmenem lidského papilomaviru (HPV) [2], což ukazuje, že infekce HPV je předpokladem této karcinogeneze. Ženy s negativním výsledkem testu na HPV mají extrémně nízké riziko karcinomu děložního čípku. Je ovšem pravda, že k prekanceróze nebo karcinomu nedojde ani u většiny žen s pozitivním nálezem. Prekancerózní léze na čípku se objevují pouze u cca 15 % žen infikovaných HPV [3].

Pacientkám s pozitivním výsledkem HPV testu nebo nejasným nálezem Pap testu (Pap II, Pap III a Pap IIID1 a D2) může být doporučen screeningový test, jako je GynTect®, který umožní odhadnout pravděpodobnost výskytu karcinomu děložního čípku či podobného onemocnění vyžadujícího léčbu.

Výsledek stanovení GynTect® se nemá používat ke konečnému rozhodnutí o léčbě; je třeba jej vyhodnotit společně s ostatními klinickými nálezy.

## 3. PRINCIPU ZKUŠEBNÍ METODY

Základem stanovení je detekce epigenetických biomarkerů, přesněji metylace určitých oblastí DNA, které korelují s výskytem prekanceróz nebo karcinomu děložního čípku [4, 5, 6]. Navíc jsou analyzovány také markery specifické pro hydrogensířičitan a metylaci. Oblasti markerů použité v testu GynTect® uvádí Tabulka 1.

Tabulka 1 Přehled oblastí markerů u stanovení GynTect®

Označení v protokolu	Oblast markeru (název genu)
Marker metylace	ASTN1
	DLX1
	ITGA4
	RXFP3
	SOX17
	ZNF671
Kontrolní marker	ACHE
	IDS

Detekce markerů se provádí pomocí vysoce citlivého kvantitativního stanovení PCR. Výstupem kvantitativních přístrojů je hodnota Cp (Cross point, cobas z 480 Analyzer) nebo hodnota Cq (Cycle quantification, CFX96 Real-Time PCR Detection System); obě odpovídají prahové hodnotě cyklu Ct a jsou takto také níže označovány. Tato hodnota odpovídá cyklu při kvantitativní PCR, v němž fluorescence poprvé vystoupá nad definovanou prahovou hodnotu.

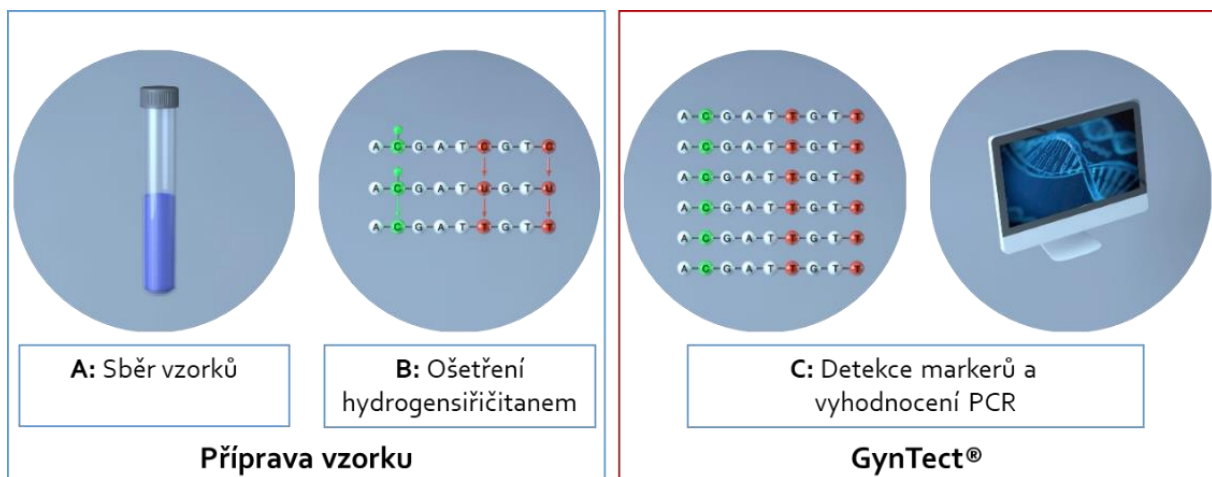
Analýza vzorku pacientky pomocí stanovení GynTect® sestává ze dvou kroků.

Nejprve je DNA ve stěru z děložního krčku ošetřena reakcí s hydrogensířičitanem sodným, přičemž dojde k „fixaci“ metylace DNA. K purifikaci DNA po konverzi hydrogensířičitanem doporučujeme použít kratší a jednodušší protokol. Po eluci se DNA naředí vodou. Ve druhém kroku je DNA konvertovaná hydrogensířičitanem analyzována v osmi samostatných (singleplex) kvantitativních PCR reakcích specifických pro metylaci. Původně metylované oblasti DNA jsou selektivně amplifikovány pomocí primerů, které jsou umístěny ve zkumavkách v osmizkumavkovém PCR stripu.

Kvantitativní detekce markeru metylace a kontrolních oblastí se provádí pomocí interkalačního fluorescenčního barviva. Navíc jsou přidány pozitivní a negativní kontroly pro kontrolu PCR. Poté je provedena analýza specifická pro stanovení.

Odběrová a hydrogensířičitanová souprava nejsou součástí GynTect® Kit. Speciální produkty pro odběr vzorků a ošetření hydrogensířičitanem se prodávají samostatně.

Princip testu ukazuje Obrázek 2.



Obrázek 2 Označování GynTect® Strips

**A:** Gynekolog provede stěr z děložního čípku pacientky a převede jej do vzorkového média.

**B:** Diagnostická laboratoř provede konverzi vzorku pacientky hydrogensířičitanem.

**C:** U každého vzorku se provádí osm singleplexových PCR reakcí. Hodnocení se provádí na základě detekce interkalačního fluorescenčního barviva v mastermixu a definovaných vrcholů denaturačních křivek.

## 4. USPOŘÁDÁNÍ STANOVENÍ GYNTECT®

### 4.1. Rozložení GynTect® Strips

Každý GynTect® Strip obsahuje osm párů primerů k amplifikaci šesti markerů specifických pro metylaci a dvou kontrolních markerů. Rozložení stripu ukazuje Obrázek 3.

K analýze jednoho vzorku pacientky je nutný úplný GynTect® Strip.



Obrázek 3 Rozložení GynTect® Strips

Každá z pozic 1-6 na PCR stripech obsahuje primer pro jeden z markerů specifických pro metylaci. Na pozici číslo 7 jsou primery ke kontrole kvality hydrogensířičitanové reakce (ACHE), na pozici 8 pak primery ke kontrole kvality metylace (IDS-M).

### 4.2. Kontroly

GynTect® Kit obsahuje několik kontrol. Tyto kontroly umožňují sledování kritických kroků testu: kvality vzorku a ošetření hydrogensířičitanem (ACHE), stavu metylace vzorku (IDS-M) a kvality PCR reakcí.

#### 4.2.1. Kontrola kvality konverze hydrogensířičitanem (ACHE)

Tento kontrolní marker ověřuje úspěšnost konverze všech nemetylovaných cytosinových zbytků na uracil, a tedy kvalitu ošetření hydrogensířičitanem. Pro tento účel je amplifikována oblast DNA z genu lidské acetylcholinesterázy (ACHE). Nedostatečná amplifikace ACHE naznačuje, že je stanovení neplatné a je nutno jej opakovat.

#### 4.2.2. Kontrola kvality metylace (IDS-M)

Tato kontrola umožňuje amplifikaci imprintovaného genu IDS, který je metylován na druhém ženském chromozomu X (IDS-M). Pokud PCR reakce poskytne hodnotu Cp mezi 20 a 32, je cervikální vzorek platný. Pokud nedojde k žádné amplifikaci, stanovení je nutno pokládat za neplatné a je nutno jej opakovat.

#### 4.2.3. Pozitivní kontrola

Součástí soupravy je i kontrolní matrice k ověření kvality PCR reakce. Při amplifikaci kontrolní matrice (PC) testu GynTect® Positive Controlby všech osm markerů mělo poskytnout hodnotu Cp pod 38. PCR reakce s jinou hodnotou jsou neplatné a je třeba je opakovat.

#### 4.2.4. Negativní kontrola

Jako negativní kontrola se provádějí reakce s matricí GynTect® Water (NTC – kontrola bez matrice). Výsledek těchto reakcí by měl být negativní pro všechny markery. Pokud u některé z nich vzniknou specifické produkty reakce, mohlo dojít ke kontaminaci a stanovení GynTect® je třeba opakovat.

## 5. REFERENČNÍCH MATERIÁLŮ

Nejsou dostupné žádné mezinárodní referenční materiály.

## 6. OBSAH SOUPRAVY

Tabulka 2 Obsah GynTect® Kit

Součást	Symbol	Obsah	Objem/množství	
			GT003-06	GT003-10
GynTect® Mastermix	<b>PCR-MM</b>	2 x PCR mastermix <sup>1</sup>	1 x 1,1 ml	1 x 1,1 ml
GynTect® Strips	<b>STRIPS</b>	PCR stripy <sup>2</sup> na vzorky pacientek (zelená víčka)	6 stripů	10 stripů
		PCR stripy <sup>2</sup> na pozitivní kontroly (červená víčka)	3 stripy	1 strip
		PCR stripy <sup>2</sup> na negativní kontroly (žlutá víčka)	3 stripy	1 strip
GynTect® Caps	<b>CAPS</b>	Stripy s víčky na PCR	12 víčkové stripy	12 víčkové stripy
GynTect® Positive Control	<b>CONTROL+</b>	Pozitivní kontrola	1 x 260 µl	1 x 90 µl
GynTect® Water	<b>H<sub>2</sub>O</b>	Voda	1 x 2 ml	1 x 2 ml
Návodem k použití	-	Návodem k použití	1	1

<sup>1</sup> Obsahuje všechny složky potřebné pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) kromě primeru a matrice.

<sup>2</sup> Obsahuje primery potřebné k PCR.

## 7. SPOTŘEBNÍ MATERIÁL A VYBAVENÍ (NENÍ SOUČÁSTÍ SOUPRAVY)

Stanovení GynTect® může provádět pouze kvalifikovaný personál, a to s pomocí uvedeného materiálu a vybavení. Veškeré laboratorní vybavení musí být nainstalováno, udržováno, používáno a kalibrováno podle pokynů výrobce.

Pokojovou teplotou se rozumí teplota mezi 15 a 30 °C.

Tabulka 3 Potřebné vybavení

Vybavení	Katalogové č.	Objednávky
EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10) *	Z102	order@oncgnostics.com
ThinPrep® PreservCyt® Solution (20 ml)	-	od Hologic Inc.
Cervex-Brush® nebo Cervex-Brush® Combi	-	od Rovers Medical Devices

\* Soupravu EpiTect® Fast Bisulfite Kit (katalogové č. QIAGEN: 59802) nezaměňujte se soupravou EpiTect® Bisulfite Kit!



Stanovení GynTect® vyžaduje dále uvedené laboratorní vybavení a spotřební materiál.

- Odstředivka na reakční zkumavky 0,5 ml / 1,5 ml,  $\geq 10\ 000\ g$
- Odstředivka na PCR stripy
- Termocykler na reakční zkumavky 0,5 ml
- Vířivá třepačka / třepačka
- Pipety s různým rozsahem objemu a příslušné špičky s filtrem (sterilní, beze stop DNázy)
- Reakční zkumavky 0,5 ml / 1,5 ml (beze stop DNázy)
- Stojánek na reakční zkumavky 0,5 ml / 1,5 ml
- Nedenaturovaný ethanol (96-100 %)
- Příklad pro kvantitativní PCR, detekční kanál pro FAM/SYBRGreen

GynTect® Kit byl validován na přístrojích:

- cobas z 480 Analyzer (Roche Diagnostics GmbH) s blokem s 96 jamkami, adaptérem pro PCR stripy a zařízení LightCycler® 480 SW UDF 2.0.0 (Service Pack 3), vyhodnoceno s verzí 1.5.1.62
- CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) s verzí softwaru CFX Maestro 2.3
- CFX Opus 96 (Dx) Real-Time PCR Detection System™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.) s verzí softwaru CFX Maestro 2.3

## 8. UCHOVÁVÁNÍ A DOBA POUŽITELNOSTI

Při správné přepravě a uchovávání lze GynTect® Kit a jeho komponenty používat až do uvedeného data. Všechny reagentie obsažené v soupravě jsou po otevření stabilní do uvedeného data expirace, pokud jsou uchovávány za uvedených podmínek a chráněny před kontaminací (viz Tabulka 4).

Tabulka 4 Teplota skladování GynTect® Kit a vybavení neobsaženého v soupravě

Vybavení	Teplota skladování
GynTect® Kit	2 °C až 8 °C
EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10) s výjimkou	15 °C až 25 °C
Spin Columns, DNA Protect Buffer, Buffer BD	2 °C až 8 °C
ThinPrep® PreservCyt® Solution (20 ml)	15 °C až 30 °C
Cervex-Brush® or Cervex-Brush® Combi	15 °C až 30 °C

## 9. BEZPEČNOSTNÍ POKYNY

### 9.1. Obecné informace

Při použití moderních metod molekulární biologie je nutno přesně dodržovat dále uvedené pokyny, aby byla zajištěna maximální bezpečnost personálu laboratoře a byly dosaženy vysoce kvalitní výsledky:

- Protože tato souprava využívá molekulárně-biologické procesy, jako je konverze hydrogensířičitanem, amplifikace a detekce DNA, je určena pouze pro diagnostiku *in vitro* a má ji používat pouze personál vyškolený v laboratorních metodách pro diagnostiku *in vitro*.
- Před použitím výrobku si pozorně přečtěte návod k použití. Je nutné brát v úvahu pouze aktuální verzi.
- Při každém kroku noste vhodný laboratorní plášť, jednorázové rukavice a v případě potřeby i ochranné brýle.
- Vyhněte se přímému kontaktu s biologickými vzorky a dbejte také, aby nedošlo k jejich vystříknutí nebo rozprášení.
- Vyhřívané víko a inkubační blok termocyklieru mohou dosahovat teploty až 110 °C. Je zde nebezpečí popálení kůže. Dodržujte provozní pokyny pro zařízení.
- Po manipulaci se vzorky a činidly si důkladně umyjte ruce.
- Nepoužívejte soupravu GynTect®, pokud je balení činidel porušené. Kontaktujte svého distributora.
- GynTect® Kit nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti a nepoužívejte prošlá činidla.
- Nemíchejte činidla z různých šarží, a také nemíchejte činidla ze soupravy s činidly od jiných výrobců.
- Používejte pouze materiály dodávané se soupravou nebo doporučené jejím výrobcem.

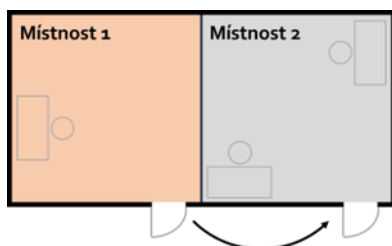
- Veškeré vyžadované laboratorní vybavení musí být nainstalováno, kalibrováno, používáno a udržováno podle pokynů výrobce.
- Pipetování malých objemů kapaliny (několika mikrolitrů) vyžaduje praxi. Ujistěte se, že pipetujete vyžadované objemy mikropipetami co nejpřesněji.
- Je nezbytné dodržovat relevantní regulační požadavky týkající se obsluhy.
- Předpokládá se dodržování správné laboratorní praxe (GLP), jak ji definuje např. Úřad pro kontrolu potravin a léků USA (FDA) nebo Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj (OECD). Konkrétně je třeba zohlednit doporučení ohledně provádění testů s použitím molekulární amplifikace.
- Řádné fungování přístrojů PCR je zaručeno pouze za pokojové teploty.

## 9.2. Oddělení prostor

Z důvodu vysoké analytické citlivosti PCR je nutno věnovat důkladnou pozornost dodržování čistoty součástí soupravy a vzorků.

PCR znásobí úseky DNA ve vzorku milionkrát až miliardkrát. I to nejmenší množství produktů PCR (které se mohou šířit i formou aerosolu) může způsobit falešný výsledek, pokud dojde k jejich přenosu do materiálu vzorku, do činidel pro ošetření hydrogensířičitanem nebo do činidel PCR v této soupravě.

Proto je čistý a dobře strukturovaný pracovní postup kriticky důležitý pro prevenci nesprávných výsledků. Z toho důvodu je nutné oddělit laboratorní prostory pro přípravu vzorků a vlastní PCR. V každém laboratorním prostoru je třeba zajistit samostatné vybavení, spotřební materiál, laboratorní pláště a rukavice. Laboratorní pláště, rukavice ani vybavení nikdy nepřenášejte z jednoho prostoru do druhého. Obrázek 4 ukazuje příklad laboratoře rozdělené na dvě samostatné místnosti. Jeden prostor je určen pouze pro ošetření hydrogensířičitanem a přípravu PCR, zatímco ve druhém se provádí PCR.



Obrázek 4 Oddělení prostor

*V 1. místnosti se provádí ošetření hydrogensířičitanem a příprava PCR (ideálně v PCR digestoři). Ve 2. místnosti se provádí PCR, detekují markery a analyzují výsledky.*

## 9.3. Prevence kontaminace

- Během všech kroků je nutno mít na sobě laboratorní plášť a jednorázové rukavice.
- Jednorázové rukavice je třeba vyměňovat často a pokaždé při (podezření na) kontaminaci činidly nebo materiálem vzorku.
- Všechny povrchy, vybavení a materiál je třeba dekontaminovat vhodným čisticím roztokem (činidla působící rozklad DNA).
- Nedotýkejte se vnitřku reakčních zkumavek ani jejich víček.

- Při pipetování vždy používejte špičky s filtrem (beze stop DNázy, RNázy a lidské DNA) k vyloučení zkřížené kontaminace aerosoly, které vznikají během pipetování. Špičky je třeba vždy vyměnit mezi jednotlivými kroky pipetování.
- Je důležité provádět negativní kontroly kvůli detekci případné kontaminace.

#### **9.4. Pokyny k manipulaci**

- Nepoužité součásti soupravy uchovávejte v původním balení až do jejich použití.
- Veškeré odstředování se provádí při pokojové teplotě.
- Po ošetření hydrogensířičitanem je možno pracovní postup přerušit. V této fázi lze vzorky uchovávat jeden týden při teplotě 2 - 8 °C. nebo až dva měsíce při teplotě - 15 až - 30 °C.
- Při snímání barevných víček ze stripů pro PCR se nikdy nedotýkejte vnitřku víček; víčka likvidujte předepsaným způsobem.
- Během celého postupu se nedotýkejte GynTect® Strips a GynTect® Caps bez jednorázových rukavic; v opačném případě mohou vzniknout nespecifické fluorescenční signály.
- Pokud budou GynTect® Strips a GynTect® Caps označeny na nesprávných místech, mohou při PCR vzniknout nespecifické fluorescenční signály.
- GynTect® Strips a GynTect® Caps jsou určena k jednomu použití a nelze je používat opakovaně.
- Nepoužité GynTect® Strips a GynTect® Caps uchovávejte v původním obalu.

#### **10. LIKVIDACE**

Nepoužité GynTect® Kit a jejich součásti lze zlikvidovat bez zvláštních bezpečnostních opatření. Se vzorky pacientek a použitými reakčními zkumavkami je nutno zacházet jako s infekčním odpadem. Likvidace veškerých činidel musí být v souladu s platnými právními předpisy.

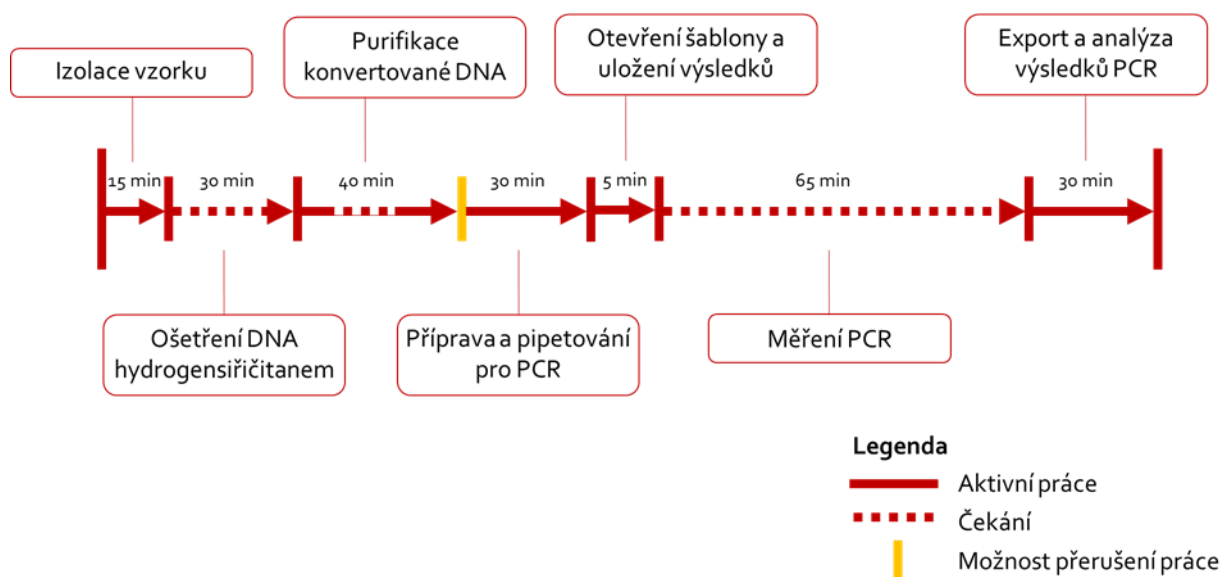
## 11. POSTUP STANOVENÍ GYNTECT®

Následující kapitola obsahuje podrobný popis jednotlivých kroků zpracování, od odběru vzorků až k analýze údajů. GynTect® Kit GTo03-10 obsahuje jednu pozitivní a jednu negativní kontrolu na jedno měření GynTect®. Všech deset vzorků je nutno použít v rámci jednoho pracovního postupu.

### 11.1. Časový rozvrh pracovního postupu

Stanovení GynTect® lze provést během méně než 4 hodin, přičemž aktivní manipulace vyžaduje zhruba 2 hodiny. Před prvním použitím stanovení GynTect® si vyhradte přibližně 15 minut na naprogramování šablony programu PCR pro stanovení.

Obrázek 5 ukazuje podrobné body pracovního postupu.



Obrázek 5 Časový rozvrh pracovního postupu GynTect® GTo03

### 11.2. Odběr vzorků

Odběrová ani hydrogensířičitanová souprava nejsou součástí GynTect® Kit. Lahvičku s roztokem ThinPrep® PreservCyt® (Hologic) a kartáček Cervex-Brush® (Rovers Medical Devices) lze koupit od jejich příslušných výrobců. Lékař má provádět odběr cervikálního vzorku podle pokynů výrobce a v souladu s obecně přijímanými zásadami pro odběr vzorků cervikálního stěru [7].

**Důležité upozornění:** Kartáček je nutno po odběru zlikvidovat; nesmí zůstat ve vzorkovém médiu, protože by to ovlivnilo funkci stanovení GynTect®.

Jako médium pro stěr je nutno použít roztok ThinPrep® PreservCyt®. Spolehlivost stanovení GynTect® nebyla ověřena při použití jiných odběrových médií.

Zajištění dobré kvality vzorku DNA, který se bude používat, je důležitým předpokladem platnosti stanovení. Nesprávný odběr vzorku, ošetření hydrogensířičitanem a uchovávání DNA mohou vést k neplatným nebo i falešně negativním výsledkům.

Cervikální vzorky lze přepravovat k testování do laboratoře bez chlazení. Vzorky lze uchovávat po dobu až 1,5 roku při teplotě 2 až 30 °C.

### 11.3. Příprava vzorku

Následující kroky musí být provedeny v prostoru pro přípravu vzorků (1. místnost).

**Důležité upozornění:** Pokud je kartáček ještě stále v odběrové lahvičce, je nutné jej zlikvidovat před zpracováním vzorku.

1. Vzorek pacientky promíchejte na vířivé třepačce po 5 s při maximální rychlosti a 1 ml vzorku okamžitě přeneste do 1,5 ml zkumavky.

**Pozor:** Buňky se velmi rychle usazují na dně lahvičky. Vzorek pacientky je nutno použít do 10 s po protřepání.

2. Odstřeďte vzorek po 5 min při 10 000 g.
3. Opatrně odstraňte 900 µl supernatantu nad peletou. Peletu neodstraňte ani nenarušte.

**Pozor:** Peleta může být více či méně přilnavá v závislosti na vzorku.

4. Peletu resuspendujte protřepáním po 3 s na vířivé třepačce. 40 µl resuspendovaného vzorku se použije pro ošetření hydrogensířičitanem.

### 11.4. Ošetření vzorků hydrogensířičitanem

Hydrogensířičitanová souprava není součástí GynTect® Kit. Validace stanovení GynTect® byla provedena se soupravou EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10) (Qiagen).

**Pozor:** Původní protokol soupravy EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10) (Qiagen) byl upraven. Použití tohoto upraveného protokolu je předpokladem dosažení zde uvedených funkčních parametrů.

#### 11.4.1. Konverze DNA hydrogensířičitanem

1. Pufr z hydrogensířičitanové soupravy připravte podle Tabulka 5.

**Důležité upozornění:** Buffer BL se používá bez *Carrier RNA*. Při přepravě nebo uchování Buffer BL při nízkých teplotách je možná tvorba sraženin. V takovém případě rozpustěte sraženinu opatrným ohřátím (37 °C) a protřepáním Buffer BL.

Tabulka 5 Pufr pro soupravu EpiTect® Fast Bisulfite Kit (Qiagen)

Pufr	Přidání ethanolu	Teplota uchování
Buffer BL *	-	Pokojová teplota
Buffer BW	30 ml ethanolu (96 - 100 %)	Pokojová teplota
Buffer BD	27 ml ethanolu (96 - 100 %)	2 - 8 °C

\* Nepřidávejte *Carrier RNA*, kontrola kvality (viz poznámka)

2. Pro každý vzorek připravte do 0,5ml zkumavek reakční směs s hydrogensířičitanem podle Tabulka 6.

**Důležité upozornění:** Při přepravě nebo uchování Bisulfite Solution při nízkých teplotách je možná tvorba sraženin. V takovém případě rozpustěte sraženinu opatrným ohřátím (37 °C) a protřepáním Bisulfite Solution.

Tabulka 6 Materiály pro ošetření hydrogensířičitanem

Látka	Na reakci
Bisulfite Solution *	85 µl
DNA Protect Buffer	15 µl
Připravený a resuspendovaný vzorek	40 µl
Celkový objem na reakci	140 µl

\* kontrola kvality (viz poznámka)

**Pozor: Bisulfite Solution** nelze uchovávat. Jeden **Bisulfite Solution** lze použít pouze na jediný proces, zbytek je nutno zlikvidovat.

3. Reakční směs k ošetření hydrogensířičitanem promíchejte na vířivé třepačce po 3 s při maximální rychlosti, krátce odstředte a ponechte při pokojové teplotě do použití.

**Pozor:** Je-li pH směsi ve správném rozsahu, **DNA Protect Buffer** změni barvu ze zelené na modrou. Vzorek je nutno zpracovat do 60 min.

4. Použijte termocykler s vytápěným víkem (100 °C) a naprogramujte jej podle Tabulka 7.

**Důležité upozornění:** Pokud termocykler nelze nastavit na objem 140 µl, použijte následující možný programovatelný objem. Víko není třeba před zahájením konverze přehřívát.

Tabulka 7 Konverze hydrogensířičitanem pomocí termocykleru

Krok	Trvání	Teplota
Denaturace	5 min	95 °C
Inkubace	10 min	60 °C
Denaturace	5 min	95 °C
Inkubace	10 min	60 °C
Konec reakce	Udržovat*	20 °C

\* Konvertovaná DNA může zůstat v termocykleru nebo ji lze skladovat při pokojové teplotě přes noc (max. 16 h).

5. Umístěte 0,5 ml zkumavky do topného bloku termocykleru a zahajte inkubaci.

**Pozor:** Po ošetření hydrogensířičitanem lze vzorky skladovat při pokojové teplotě přes noc (max. 16 hodin). Neuchovávejte v chladu (při teplotách 2 °C - 8 °C) – vzorky by mohly precipitovat a znemožnit tak další zpracování.

#### 11.4.2. Purifikace konvertované DNA

6. Po ošetření hydrogensířičitanem PCR zkumavky promíchejte maximální rychlostí na vířivé třepačce po 3 s a krátkým odstředěním stáhněte kapky ze vnitřku víčka.

7. Do každé MinElute® Spin Column přidejte **310 µl Buffer BL**.

**Důležité upozornění:** Centrifugační kolonku MinElute® zřetelně označte.

8. Přidejte do centrifugační kolonky vzorek (140 µl) a směs krátce 5x promíchejte pipetováním.

**Důležité upozornění:** Nedotýkejte se membrány v kolonce špičkou pipety a dbejte, aby nevznikaly bubliny. Po 5 promíchání pipetou se ujistěte, že je roztok homogenní a neobsahuje vrstvy.

9. Do každé centrifugační kolonky přidejte **250 µl ethanolu** (96 - 100 %), zavřete víčko a krátce 5x promíchejte převrácením kolonky na čepu (180°).
10. Každou kolonku odstřeďte po 30 s při 18 000 g a ujistěte se, že kapalina prošla kolonkou do collection tube.
11. Vyjměte kolonku z odstředivky, zlikvidujte proteklou kapalinu a usadte kolonku zpět do collection tube.
12. Promývání: do centrifugační kolonky přidejte **200 µl Buffer BW** a odstřeďte 30 s při 18 000 g.
13. Do každé kolonky přidejte **200 µl Buffer BD** a inkubujte 15 min při pokojové teplotě (15 °C - 30 °C.).
14. Po dokončení desulfonace odstřeďte kolonku po 30 s při 18 000 g.
15. Přidejte **200 µl Buffer BW** a odstřeďte po 30 s při 18 000 g.
16. Vyjměte kolonku z odstředivky, zlikvidujte proteklou kapalinu a usadte kolonku zpět do collection tube.
17. Centrifugační kolonku promyjte **400 µl Buffer BW** a odstřeďte po 30 s při 18 000 g.
18. Do každé centrifugační kolonky přidejte **200 µl ethanolu** (96 - 100 %) a odstřeďte po 30 s při 18 000 g.
19. Centrifugační kolonku vložte do nové 2ml zkumavky a odstřeďte po 60 s při 18 000 g k odstranění zbytků kapaliny.

**Pozor:** Tento krok nevynechte – zbytky ethanolu mohou mít negativní vliv na výsledky stanovení GynTect®.

20. Centrifugační kolonku vložte do čisté 1,5 ml zkumavky (není součástí soupravy), přidejte 20 µl vody přímo na střed membrány v kolonce a opatrně zavřete víčko.

**Důležité upozornění:** Dbejte, aby nedošlo k poškození membrány a nepipetujte vodu na stěnu kolonky.

21. Centrifugační kolonku inkubujte při pokojové teplotě po 60 s a pak odstřeďte po 60 s při 8000 g (eluze).
22. Vizualně zkontrolujte, zda má eluát správný objem.

**Volitelné:** V této fázi lze vzorky skladovat až týden při teplotě 2 °C - 8 °C nebo až 2 měsíce při teplotě -15 až -30 °C.



## 11.5. PCR

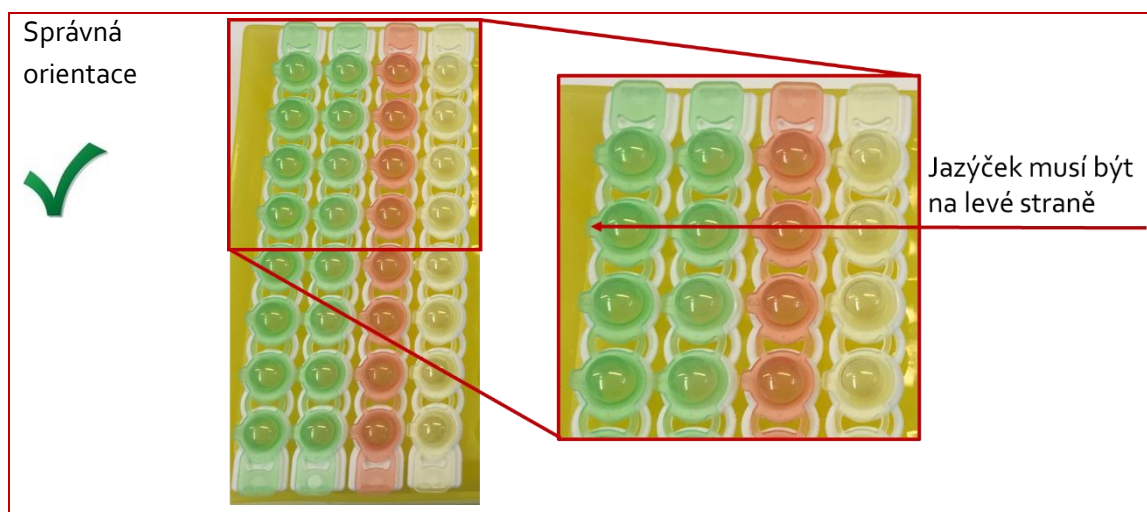
Před zahájením PCR se přesvědčte, že teplotní protokol PCR je naprogramován do vhodného přístroje pro kvantitativní PCR; snižte tak na minimum dobu mezi přípravou a zahájením PCR. Program pro PCR založte na cobas z 480 Analyzer podle popisu na straně 19. Vysvětlení pro PCR na CFX96 Real-Time PCR Detection System najdete na stránce 22 a dále.

### 11.5.1. Příprava a pipetování PCR reakce

**Důležité upozornění:** Příprava PCR a pipetování by neměly trvat déle než 60 minut. Tento krok se provádí v 1. místnosti (prostor pro přípravu).

Podívejte se na rozložení destičky popsané na straně 19 nebo na straně 22. Pozitivní kontrola (PC) musí být umístěna v řádku 11 a negativní kontrola (NTC) v řádku 12.

1. Ke každému vzorku přidejte **70 µl GynTect® Water**.
2. Vzorky promíchejte na vířivé třepačce po 3 s s maximální rychlostí a krátce odstředte.
3. Ze soupravy vezměte činidlo **GynTect® Mastermix**. Na každý vzorek použijte **GynTect® Strip** se zeleným víčkem, na pozitivní kontrolu **GynTect® Strip** s červeným víčkem a na negativní kontrolu **GynTect® Strip** se žlutým víčkem.
4. **GynTect® Strip** uložte do PCR držáku. Dbejte na správnou orientaci **GynTect® Strip** (viz Obrázek 6).



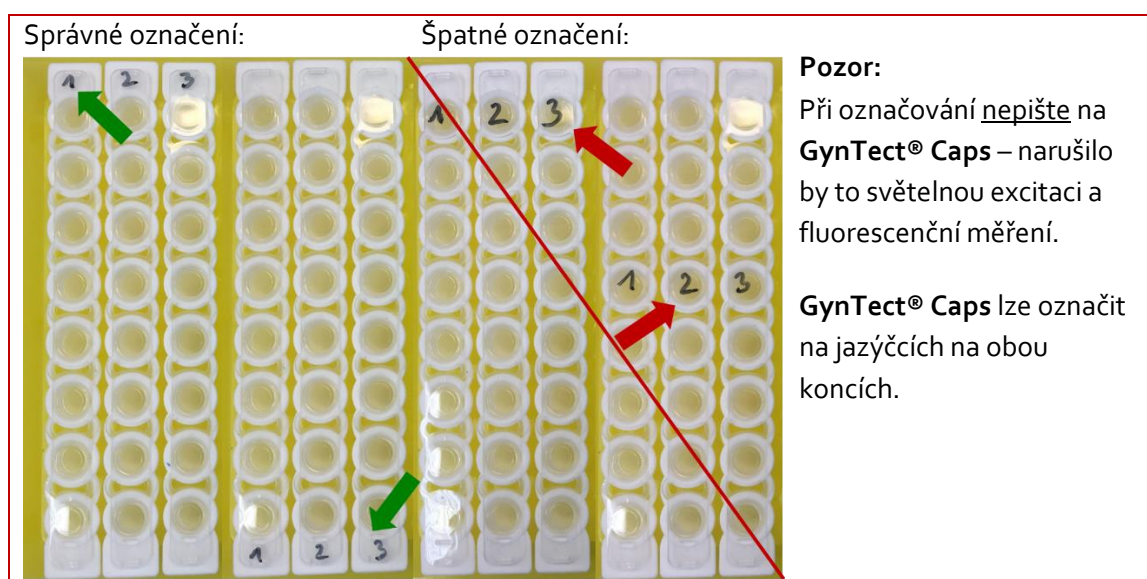
Obrázek 6 Orientace GynTect® Strips

5. Promíchejte **GynTect® Mastermix** maximální rychlostí na vířivé třepačce po 3 s a krátce odstředte.
6. Sejměte stripy s barevnými a okrouhlými víčky ze **GynTect® Strip** a zlikvidujte je.
7. Do každé zkumavky na **GynTect® Strip** přidejte **10 µl** činidla **GynTect® Mastermix**.

**Poznámka:** Zpozorujete modré zbarvení. To slouží jako optická kontrola a nijak to neovlivňuje výsledek stanovení GynTect®.

**Důležité upozornění:** Každou zkumavku stripu napipetujte novou špičkou – **GynTect® Strip** již obsahují primery pro PCR.

8. Do každé z osmi jamek **GynTect® Strip** přidejte **10 µl vzorku**.  
**Důležité upozornění:** Každou zkuševku ve stripu napipetujte novou špičkou.  
**Poznámka:** Zbylé eluáty vzorků uchovejte pro případné opakování PCR GynTect®.
9. Ihned po pipetování **GynTect® Strips** uzavřete plochými čirými **GynTect® Caps**.  
**Pozor:** Nedotýkejte se vnitřků **GynTect® Caps** a **GynTect® Strips**. Zkontrolujte, zda jsou **GynTect® Strips** pevně uzavřeny. Kontrola se nejlépe provádí vizuálně z boku.
10. Promíchejte pozitivní kontrolu GynTect® maximální rychlostí na vířivé třepače po 3 s a krátce odstředte.
11. Do každé z osmi jamek **GynTect® Strips** pro pozitivní kontrolu přidejte **10 µl GynTect® Positive Control** a do každé z osmi jamek **GynTect® Strips** pro negativní kontrolu přidejte **10 µl GynTect® Water**.
12. Ihned po pipetování **GynTect® Strips** uzavřete plochými čirými **GynTect® Caps**.  
**Pozor:** Nedotýkejte se vnitřků **GynTect® Caps** a **GynTect® Strips**. Zkontrolujte, zda jsou **GynTect® Strips** pevně uzavřeny. Kontrola se nejlépe provádí vizuálně z boku.
13. Po dokončení pipetování a uzavření nových **GynTect® Caps** s jazýčky označte všechny **GynTect® Strips** (viz Obrázek 7).



Obrázek 7 Označování GynTect® Strips

14. Všechny uzavřené **GynTect® Strips** promíchejte po 3 s maximální rychlostí na vířivé třepače a krátce odstředte.

### 11.5.2. Provádění PCR na cobas z 480 Analyzer

V následující části je popsáno provádění stanovení GynTect® na systémech pro kvantitativní PCR: na cobas z 480 Analyzer (označeno modře) a na CFX96 Real-Time PCR Detection System (označeno zeleně). Při provozu přístrojů PCR však také vždy dodržujte pokyny výrobce.

PCR provádějte ve 2. místnosti laboratoře.

#### 11.5.2.1. Vytvoření šablony PCR

Pokud jste šablonu PCR vytvořili a uložili dříve, můžete pokračovat bodem 11.5.2.2 *Zahájení měření PCR*.

1. Zapněte cobas z 480 Analyzer a odpovídající počítač. Do 15 sekund musíte na obrazovce počítače v BIOSu zvolit možnost „User defined Workflow“, aby se systém přepnul do volně programovatelného režimu.
2. Chcete-li vytvořit novou šablonu, zvolte tlačítko *New Experiment*. Na kartě *Run Protocol* nastavte parametr *Detection Format* na hodnotu SYBR Green 1 / HRM Dye a parametr *Reaction Volume* na 20 µl. Naprogramujte teplotní profil podle Tabulka 8.

Tabulka 8 Teplotní protokol PCR na cobas z 480 Analyzer

Program Name	Number of cycles	Analysis Mode	Target	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp rate (°C/s)
Initialization	1 x	None	94 °C	None	00:01:00	4.4
Amplification	42 x	Quantification	94 °C	None	00:00:15	4.4
			66 °C	Single	00:00:35	2.2
Melt curve	1 x	Melting Curves	95 °C	None	00:00:15	4.4
			60 °C	None	00:00:20	2.2
			95 °C	Continuous	-	0.11
Cooling	1 x	None	37 °C	None	00:01:00	2.2

3. Uložte šablonu *Run-Template* pod názvem *GynTect*.

#### 11.5.2.2. Zahájení měření PCR

Pokud jste šablonu PCR uložili dříve, můžete ji nyní vyvolat. Zkontrolujte, zda je nastaven správný teplotní protokol.

1. V modulu *Subset Editor* vytvořte doporučené rozložení destičky (viz Obrázek 8 a Obrázek 9).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5	Vzorek 6					PC	NTC
E							.	.	.	.		
F												
G												
H												

Obrázek 8 Příklad rozložení destičky – šest vzorků pacientek

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5	Vzorek 6	Vzorek 7	Vzorek 8	Vzorek 9	Vzorek 10	PC	NTC
E												
F												
G												
H												

Obrázek 9 Příklad rozložení destičky – 10 vzorků, souprava GTo03-10

**Důležité upozornění:** Rozložení destiček není variabilní. Pozitivní kontrola (PC) musí být umístěna v řádku 11 a negativní kontrola (NTC) v řádku 12.


2. V modulu *Sample Editor* definujte označení vzorku.
3. Stripy vložte do přístroje PCR vertikálně v definovaném pořadí.

**Důležité upozornění:** Použijte adaptér pro PCR stripy (lze objednat u Roche Diagnostics GmbH).

4. Měření PCR uložte kliknutím na *tlačítko s obrázkem diskety* do příslušné složky pod jednoznačným názvem a spusťte měření kliknutím na tlačítko *Start Run* na kartě *Run Protocol*.

### 11.5.2.3. Export dat

Pokud měření PCR analyzujete přímo na počítači cobas z 480 Analyzer, pokračujte bodem 11.5.2.4 *Nastavení vyhodnocování v softwaru přístroje*.

Po dokončení PCR (Run complete) exportujte měření PCR pomocí tlačítka  „Export“ a uložte soubor do příslušné složky.

#### 11.5.2.4. Nastavení vyhodnocování v softwaru přístroje

Pokud jste exportovali měření PCR, spusťte na jiném počítači software LightCycler® 480 a otevřete/importujte měření PCR. Jinak můžete analýzu provést na počítači cobas z 480 Analyzer.

1. Zvolte algoritmus *Abs Quant/Fit Point* v editoru *Analysis* a případně i nadefinovaný počet vzorků.
2. Na kartě *Cycle Range* nastavte parametr *Background* na hodnotu 5 až 20, parametry *Min Offset* na hodnotu 4 a *Max Offset* na 19. Zkontrolujte nastavení prvního a posledního cyklu (*First Cycle* a *Last Cycle*), rozsah v parametru *Cycle Range* musí obsahovat hodnoty 1 až 42.
3. Na kartě *Noise Band* zkontrolujte, zda je parametr *STD Multiplier* nastaven na hodnotu 12 a hodnota *Noise Band* je vypočítána automaticky.
4. Na kartě *Analysis* nastavte *Threshold* na 0,5 a zkontrolujte, zda se hodnota parametru *Fit Points* upraví na 2.
5. Následně nastavení potvrďte kliknutím na tlačítko *Calculate* a proveďte analýzu. Vyexportujte tabulku dat kliknutím pravým tlačítkem myši jako soubor .txt a uložte jej do příslušné složky pod jednoznačným názvem.
6. Vraťte se do editoru *Analysis* a vyberte v něm algoritmus *Tm Calling* a případně i nadefinovaný počet vzorků.
7. Zaškrtněte políčko *Height* u parametru *Tm*; nastavení potvrďte kliknutím na tlačítko *Calculate* a proveďte analýzu. Vyexportujte tabulku dat kliknutím pravým tlačítkem myši jako soubor .txt a uložte jej do příslušné složky pod jednoznačným názvem.

Kapitola 11.6 popisuje analýzu a interpretaci dat PCR.

### 11.5.3. Provádění PCR na CFX96 Real-Time PCR Detection System

Při provozu přístrojů PCR však také vždy dodržujte pokyny výrobce.

PCR provádějte ve 2. místnosti laboratoře.

#### 11.5.3.1. Vytvoření šablony PCR

1. Zapněte přístroj PCR.
2. Naprogramujte teplotní protokol podle popisu v Tabulka 9 výběrem a úpravou teplotních kroků a časů.

Tabulka 9 Teplotní protokol PCR\*\* na CFX96 Real-Time PCR Detection System

Programme Name	Step	Number of cycles	Temperature	Time (m:ss)
Initialization	1	1 X	94 °C	1:00
Amplification	2		94 °C	0:15
	3*	42 X	66 °C	0:35
	4		GO TO Step 2	41 X
Melt Curve	5	1 X	95 °C	0:15
	6*	1 X	65 °C 95 °C	0:05 0.5 °C/cycle
Cooling	5	1 X	37 °C	1:00

\* Signál fluorescence je detekován prostřednictvím „Plate Read“ ve 3. a 6. kroku, což symbolizuje symbol kamery.

\*\* V CFX96 Real-Time PCR Detection System je výchozí rychlost ohřevu 5 °C/s. Toto nastavení bylo použito při validaci tohoto IVD testu.

3. Nastavte parametr *Volume* na 20 µl a teplotu *Lid* na 105 °C.
4. Uložte šablonu PCR Template pod názvem *GynTect*.

#### 11.5.3.2. Zahájení měření PCR

Pokud jste šablonu PCR uložili dříve, můžete ji nyní vyvolat. Zkontrolujte, zda je nastaven správný teplotní protokol.

1. GynTect® Strips vložte vertikálně do malých jamek topného bloku přístroje PCR. Vyberte vhodné rozložení destičky (viz Obrázek 10 a Obrázek 11).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5	Vzorek 6					PC	NTC
E							-	-	-	-		
F												
G												
H												

Obrázek 10 Příklad rozložení destičky – šest vzorků pacientek

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5	Vzorek 6	Vzorek 7	Vzorek 8	Vzorek 9	Vzorek 10	PC	NTC
E												
F												
G												
H												

Obrázek 11 Příklad rozložení destičky – 10 vzorků pacientek, souprava GT003-10

**Důležité upozornění:** Rozložení destiček není variabilní. Pozitivní kontrola (PC) musí být umístěna v řádku 11 a negativní kontrola (NTC) v řádku 12.

- Pojmenujte běh vhodným názvem souboru. Všimněte si, že před spuštěním běhu se detekovány SYBR/FAM.

### 11.5.3.3. Export dat

Po dokončení PCR exportujte měření PCR (soubor .pcrd).

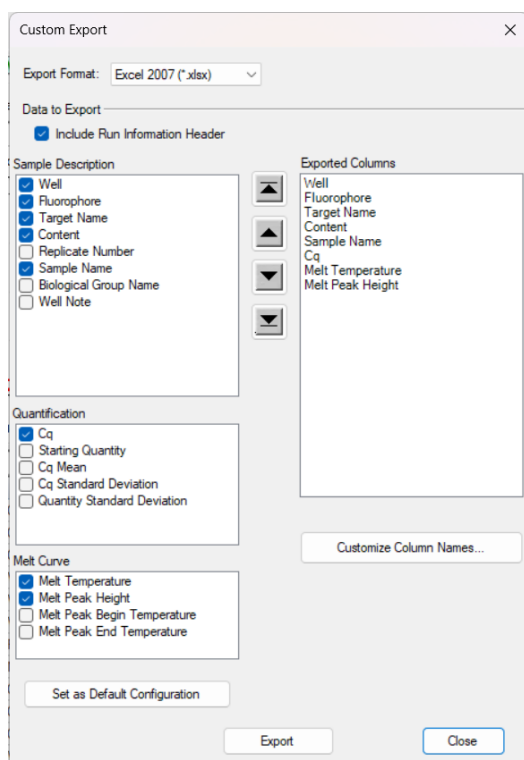
### 11.5.3.4. Nastavení vyhodnocování v softwaru přístroje

- Otevřete software Bio-Rad CFX a nejdříve nastavte *Plate Type: BR White* v položce *User* → *User Preferences* → *Plate*, čímž uvedete, že se používá bílý plast.
- Importujte soubor .pcrd.
- Definujte rozložení destičky v položce *Plate Setup* → *View/Edit Plate*. Zadejte název v položce *Sample Names*. Neobsazené pozice jsou označeny a mohou být z analýzy vyloučeny zaškrtnutím *Exclude Wells in Analysis*. Rozložení destičky potvrďte pomocí OK.
- Proveďte nastavení analýzy v položce *Settings* (viz Tabulka 10).

Tabulka 10 Nastavení analýzy na CFX96 Real-Time Detection System

Parametry	Nastavení
Cq Determination Mode	Single Threshold
Baseline Setting	Baseline Subtracted Curve Fit
	Apply Fluorescence Drift Correction
Analysis Mode	Target
Cycles to Analyze	1-42
Baseline Threshold	Baseline Cycles → User Defined: Begin: 5; End: 20
	Single Threshold → User Defined: 200

5. Na kartě *Custom Data View* vyberte *Load a Preset View* → *Amplification + Melt*. Nastavte prahovou hodnotu v položce *Melt Peak Chart* manuálně („přetažením a puštěním“) na hodnotu „nula“.
6. Na kartě *Export* vyberte *Custom Export* a proveďte následující nastavení:
  - Formát: Excel 2007 (\*.xlsx)
  - Data pro export → zaškrtněte následující políčka  
(*Include Run Information Header, Well, Fluorophore, Target Name, Content, Sample Name, Cq, Melt Temperature, Melt Peak Height*)



Obrázek 12 Custom Export

7. Stiskněte tlačítko *Export* a uložte soubor .xlsx pod jednoznačným názvem.



## 11.6. Vyhodnocení a interpretace dat PCR

Následuje popis analýzy exportovaných dat.

1. Otevřete vhodný tabulkový procesor a okopírujte do něj exportovaná data PCR.
2. Zformátujte data např. tak, že výsledky pro každý vzorek jsou umístěny ve sloupci a všechny vzorky jsou zapsány jeden vedle druhého.

Marker	Vzorek 1		Vzorek 2		Vzorek 3		Vzorek 4		Vzorek 5		Vzorek 6		PC		NTC	
	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm
ASTN1	37,42	82,99	35,62	84,44	38,76	82,74			31,81	83,58	36,51	83,41	28,42	84,55		
DLX1	33,29	81,43	33,33	81,77	30,54	80,46	34,85	81,92	30,55	81,55	38,30	81,61	28,80	82,75		
ITGA4			39,66	80,75					35,82	81,30			28,19	82,84		
RXFP3					36,77	81,47			33,52	82,68			27,80	82,43		
SOX17			36,87	85,01	39,51	82,86			39,16	82,36			31,19	85,07		
ZNF671	37,50	84,78							29,47	82,98		84,24	27,52	86,08		
ACHE	25,54	79,52	25,58	79,88	23,50	79,70	26,63	79,90	24,77	79,76	29,12	79,80	25,58	80,47		74,47
IDS-M	26,36	80,56	26,49	81,18	24,13	80,78	26,77	80,49	25,55	80,34	29,31	81,42	30,45	86,18		

### Ověření platnosti měření PCR

3. Měření PCR je **platné**, pokud pozitivní i negativní kontrola splňuje následující kritéria (viz Tabulka 11).

Tabulka 11 Kritéria platnosti pro kontroly GynTect®

Marker	Pozitivní kontrola			Negativní kontrola
	Hodnota Ct	Rozsah denaturačních teplot (cobas)	Rozsah denaturačních teplot (CFX)	Hodnota Ct
ASTN1	≥ 20, ≤ 38	80 °C – 86 °C	78 °C – 86 °C	Žádná hodnota*
DLX1	≥ 20, ≤ 38	79 °C – 85 °C	77 °C – 85 °C	Žádná hodnota*
ITGA4	≥ 20, ≤ 38	80 °C – 85 °C	78 °C – 85 °C	Žádná hodnota*
RXFP3	≥ 20, ≤ 38	80 °C – 85 °C	78 °C – 85 °C	Žádná hodnota*
SOX17	≥ 20, ≤ 38	81 °C – 87 °C	79 °C – 87 °C	Žádná hodnota*
ZNF671	≥ 20, ≤ 38	80 °C – 87 °C	78 °C – 87 °C	Žádná hodnota*
ACHE	≥ 20, ≤ 38	78 °C – 83 °C	76 °C – 83 °C	Žádná hodnota*
IDS-M	≥ 20, ≤ 38	78 °C – 88 °C	76 °C – 88 °C	Žádná hodnota*

\* **Pozor:** Negativní kontroly GynTect® by neměly mít žádné hodnoty Ct. Pokud je u kterékoliv markeru zjištěna hodnota Ct, neměla by se u ní zobrazit specifická denaturační křivka.

### Ověření platnosti a positivity vzorků

4. Výsledek pro vzorek pacientky je **platný**, pokud kontrolní markery ACHE a IDS-M splňují následující kritéria (viz Tabulka 12).

Tabulka 12 Kritéria platnosti pro kontrolní markery u vzorků pacientek

Marker	Hodnota Ct	Rozsah denaturačních teplot (cobas)	Rozsah denaturačních teplot (CFX)
ACHE	≥ 20, ≤ 42	78 °C – 83 °C	76 °C – 83 °C
IDS-M	≥ 20, ≤ 32	78 °C – 88 °C	76 °C – 88 °C

5. Výsledek GynTect® pro tento vzorek je považován za **neplatný**, pokud je při teplotě tání v definovaném rozmezí generována hodnota **Ct > 0, < 20**.
6. U **platných** vzorků vypočtete hodnotu  $\Delta Ct$  pro všechny markery specifické pro metylaci, u nichž byly zjištěny hodnoty Ct a denaturační teploty v definovaném rozsahu (viz Tabulka 13). Použijte rovnici:

#### Vyhodnocení $\Delta Ct$

$$\Delta Ct = Ct_{(\text{Marker } x)} - Ct_{(\text{IDS-M})}$$

Markery specifické pro metylaci jsou pro daný vzorek ohodnoceny **pozitivně**, pokud vypočtené hodnoty  $\Delta Ct$  souhlasí s hodnotami podle Tabulka 13.

Tabulka 13 Kritéria positivity pro markery specifické pro metylaci u vzorků pacientek

Marker	Hodnota Ct	Rozsah denaturačních teplot (cobas)	Rozsah denaturačních teplot (CFX)	Hodnota $\Delta Ct$
ASTN1	$\geq 20, \leq 42$	80 °C – 86 °C	78 °C – 86 °C	$\leq 8,00$
DLX1	$\geq 20, \leq 42$	79 °C – 85 °C	77 °C – 85 °C	$\leq 9,00$
ITGA4	$\geq 20, \leq 42$	80 °C – 85 °C	78 °C – 85 °C	$\leq 9,00$
RXFP3	$\geq 20, \leq 42$	80 °C – 85 °C	78 °C – 85 °C	$\leq 9,00$
SOX17	$\geq 20, \leq 42$	81 °C – 87 °C	79 °C – 87 °C	$\leq 9,00$
ZNF671	$\geq 20, \leq 42$	80 °C – 87 °C	78 °C – 87 °C	$\leq 10,00$

**Důležité upozornění:** Analyzujte amplifikační a denaturační křivky u sporných hodnot a parametrů křivek. Vzorky se spornými parametry křivek je nutno vyhodnotit jako neplatné.

#### Vyhodnocení stanovení GynTect®

7. Při vyhodnocení stanovení GynTect® přiřadíte následující hodnoty za každý pozitivní marker a sečtete hodnoty pro všech šest markerů:

Tabulka 14 Hodnoty pro markery GynTect®

Marker	Hodnota při pozitivním markeru	Hodnota při negativním markeru
ASTN1	2	0
DLX1	1	0
ITGA4	2	0
RXFP3	2	0
SOX17	2	0
ZNF671	6	0

Je-li **součet** hodnot za všechny markery **6 nebo více**, výsledek stanovení GynTect® pro daný vzorek je **pozitivní**.

Je-li **součet** hodnot za všechny markery **5 nebo méně**, výsledek stanovení GynTect® pro daný vzorek je **negativní**.

Pozitivní výsledek testu GynTect® koreluje s přítomností cervikální intraepiteliální neoplazie nebo karcinomu děložního čípku. Výsledek stanovení GynTect® se nemá používat ke konečnému rozhodnutí o léčbě; je třeba jej vyhodnotit společně s ostatními klinickými nálezy.

## 12. PARAMETRY STANOVENÍ GYNTECT®

Zde uváděné údaje pocházejí z cobas z 480 Analyzer.

### 12.1. Analytická parametry stanovení GynTect®

#### 12.1.1. Analytická citlivost – detekce metylované DNA

Analytická citlivost PCR stanovení byla určena pomocí metylované, hydrogensířičitanem konvertované DNA z lidského genomu. Odpovídající meze detekce uvádí souhrnně Tabulka 15. Sériově naředěné vzorky byly měřeny ve třech nezávislých testech, pokaždé v triplikátech. Na každé stanovení byly použity vzorky z běžných cervikálních stěrů v množství 20–50 ng.

Tabulka 15 Analytická citlivost PCR stanovení – část 1

Použité množství DNA	Počet buněk ve stanovení *	ASTN1 Cp ≤ 42	DLX1 Cp ≤ 42	ITGA4 Cp ≤ 42	RXFP3 Cp ≤ 42	SOX17 Cp ≤ 42	ZNF671 Cp ≤ 42
0,2 ng	30 buněk	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9
0,1 ng	15 buněk	9 / 9	9 / 9	9 / 9	8 / 8	8 / 8	9 / 9
0,05 ng	7,5 buněk	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	5 / 9	9 / 9
0,02 ng	3 buňky	7 / 9	8 / 9	6 / 9	9 / 9	6 / 9	8 / 9
0,01 ng	1,5 buňky	5 / 9	5 / 9	6 / 9	8 / 9	5 / 9	6 / 9
0,005 ng	< 1 buňka	8 / 9	7 / 9	4 / 9	6 / 9	1 / 9	6 / 9
0,002 ng	< 1 buňka	3 / 9	3 / 9	1 / 9	2 / 9	0 / 9	1 / 9

\* jedna buňka obsahuje přibližně 6–7 pg genomické DNA

Celková mez detekce, na které jsou metylační markery detekovatelné ve všech reakcích, činí 15 buněk (0,1 ng).

Kromě toho byla podobným experimentům podrobena směs metylované hydrogensířičitanem konvertované DNA z lidského genomu a nemetylované hydrogensířičitanem konvertované DNA z lidského genomu. V každém testu bylo použito 20 ng, respektive 100 ng DNA. Sériově naředěné vzorky byly měřeny ve třech nezávislých testech, pokaždé v triplikátech (viz Tabulka 16).

Tabulka 16 Analytická citlivost PCR stanovení – část 2

Procento metylované DNA	Celkové množství DNA	ASTN <sub>1</sub> ΔCp ≤ 8	DLX <sub>1</sub> ΔCp ≤ 9	ITGA <sub>4</sub> ΔCp ≤ 9	RXFP <sub>3</sub> ΔCp ≤ 9	SOX <sub>17</sub> ΔCp ≤ 9	ZNF671 ΔCp ≤ 10
10 %	20 ng	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
1 %	20 ng	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
0,1 %	20 ng	5/8*	8/8*	8/8*	6/8*	1/8*	7/8*
0,01 %	20 ng	0/9	9/9	3/9	2/9	0/9	4/9
0 %	20 ng	0/9	8/9	0/9	0/9	0/9	0/9
10 %	100 ng	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
1 %	100 ng	9/9	9/9	9/9	8/9	9/9	8/9
0,1 %	100 ng	8/9	9/9	9/9	9/9	1/9	9/9
0,01 %	100 ng	0/9	8/9	1/9	1/9	0/9	4/9
0 %	100 ng	0/9	9/9	0/9	0/9	0/9	0/9

\* Jeden z devíti vzorků byl negativní pro ACHE a musel být vyřazen.

Mez detekce pro metylační markery byla stanovena na 1 % metylované DNA u 20 ng vzorku a 10 % u vzorku se 100 ng DNA na jedno stanovení.

Experiment s obohacením vzorku pacientek o buňky SiHa ukázal, že při koncentraci alespoň  $3 \times 10^5$  buněk na ml lze spolehlivě prokázat podíl 0,1 % metylovaných buněk.

### 12.1.2. Analytická specifita – detekce nemetylované DNA

Analytická specifita PCR stanovení byla stanovena s použitím nemetylovaných hydrogensířičitanem konvertovaných PCR fragmentů o velikosti 10–12 kb reprezentujících kompletní lidský genom. Experimenty byly provedeny v 5násobném stanovení a výsledky shrnuje Tabulka 17. Platnost vzorků byla ověřena pomocí ACHE. Žádný pozitivní výsledek stanovení GynTect® se neobjevil až do koncentrace 750 ng nemetylované hydrogensířičitanem konvertované DNA (biDNA).

Tabulka 17 Analytická specifita PCR stanovení

Použitá DNA	ASTN <sub>1</sub> Cp ≤ 42	DLX <sub>1</sub> Cp ≤ 42	ITGA <sub>4</sub> Cp ≤ 42	RXFP <sub>3</sub> Cp ≤ 42	SOX <sub>17</sub> Cp ≤ 42	ZNF671 Cp ≤ 42
0 ng nemetylované biDNA	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
100 ng nemetylované biDNA	0/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5
250 ng nemetylované biDNA	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5
500 ng nemetylované biDNA	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5
750 ng nemetylované biDNA	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
75 ng metylované gDNA	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

## 12.2. Přesnost

### 12.2.1. Opakovatelnost

Pomocí stanovení GynTect® bylo třikrát měřeno 20 různých vzorků. V každém případě byla provedena nová příprava vzorků a jejich ošetření hydrogensířičitanem. Všechny tři experimenty provedla jedna osoba, ale v různých dnech. U 16 vzorků bylo ve 3 ze 3 měření dosaženo stejného výsledku. 80 % vzorků mělo tedy opakovatelnost 100 % při třech pokusech.

### 12.2.2. Reprodukovatelnost

Pomocí stanovení GynTect® bylo třikrát měřeno 20 různých vzorků v nezávislých laboratořích. V každém případě byla provedena nová příprava vzorků a jejich ošetření hydrogensířičitanem; byly také použity různé přístroje PCR (cobas z 480 Analyzer resp. LightCycler II 480). Porovnání dvou výsledků pro každý vzorek dává tři ohodnocení na jeden vzorek (laboratoř a versus laboratoř b, laboratoř b versus laboratoř c, laboratoř a versus laboratoř c). Z takto získaných dat bylo 90 % ohodnocení identických. Výsledkem vyhodnocení platných porovnání je 96,43 % reprodukovatelnost.

## 12.3. Robustnost

Žádný vliv na konečný výsledek stanovení GynTect® neměly ani dále popsané odchylky od teplotního profilu měření PCR (měření bylo prováděno se čtyřmi různými vzorky a kontrolou bez matrice):

Tabulka 18 Odchylky od teplotního profilu

Odchylka od původního protokolu	Účinky na pozitivitu GynTect® PC	Průměrný posun hodnoty Cp všechny markery
Hybridizační teplota 65 °C	žádné	< 1
Hybridizační teplota 67 °C	žádné	< 1
Denaturační teplota 92 °C	žádné	< 1
Denaturační teplota 96 °C	žádné	< 1
Denaturační teplota 96 °C a 10 s denaturace a 30 s hybridizace/elongace	žádné	až o 1,12 vyšší
Denaturační teplota 96 °C a 20 s denaturace a 40 s hybridizace/elongace	žádné	< 1

Pozice vzorku v přístroji PCR nemá žádný vliv na výsledek stanovení GynTect®.

#### 12.4. Parametry stanovení GynTect® při klinickém použití

Použité vzorky pacientek byly získány z evropských nemocnic (Německo, Portugalsko, Slovensko).

Ošetření vzorků pacientek hydrogensířičitanem bylo provedeno podle popisu v kapitole 11.4.

K posouzení použitelnosti v klinické praxi bylo pomocí stanovení GynTect® měřeno 321 vzorků pacientek s těmito parametry: Pap I (n = 199; 62 %), CIN 1 (n = 20; 6,2 %), CIN 2 (n = 28; 8,7 %), CIN 3 (n = 64; 19,9 %), karcinom děložního čípku (n = 10; 3,1 %).

Klinická citlivost a specifická byla vypočteny na základě stanovené mezní hodnoty.

Tabulka 19 Parametry stanovení GynTect® při klinickém použití

Nález	Detekce stanovením GynTect®	CI 95 %
Pap I (n = 199)	4,02 %	1,75 % – 7,77 %
CIN 1 (n = 20)	30,00 %	11,89 % – 54,28 %
CIN 2 (n = 28)	39,29 %	21,50 % – 59,42 %
CIN 3 (n = 64)	62,50 %	49,51 % – 74,30 %
CxCa (n = 10)	100 %	69,15 % – 100 %

CI = interval spolehlivosti

Tabulka 20 Citlivost a specifická

Citlivost pro CIN 3+	Specifická pro CIN 3+	Falešně pozitivních pro Pap I
67,6 %	89,9 %	4,0 %

### 13. MEZE TOHOTO POSTUPU

- Interpretaci výsledků stanovení GynTect® je třeba vždy provádět v souvislosti s výsledky dalších laboratorních diagnostických postupů, a také přitom zohlednit klinický obraz.
- Aby nevznikly chybné výsledky, je nezbytné dodržovat specifikace podle návodu k použití, např. pipetované objemy, inkubační doby, teploty a kroky přípravy.
- Správný způsob odběru vzorků a jejich uchovávání jsou kriticky důležité faktory pro výsledky testu.
- U molekulárně-biologických testů nelze z principu vyloučit, že další, velmi vzácné varianty sekvencí mohou ovlivnit výsledek testu, protože ještě nejsou obsaženy ve zdrojích použitých pro analýzu specificity a citlivosti primerů a sond.
- Provoz přístrojů mimo specifikaci, jakož i odchylky od popsaného testovacího postupu, uvedených podmínek uchovávání, materiálu, vybavení nebo doporučeného materiálu vzorků, mohou mít za následek rozdíly oproti dosaženým výsledkům při splnění všech specifikací.
- Poskytnuté interní a externí kontroly jsou pomůcky ke zjištění chyb. Nemohou však detekovat všechny možné chyby. Uživatel je odpovědný za validaci všech případně provedených modifikací nebo – pokud je to nutné – použitých přístrojů, tak aby byla zajištěna shoda se specifikacemi přístrojů.

### 14. LITERATURA

- [1] Sung, H. et al. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71(3):209-249
- [2] Walboomers, J. et al. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 189(1):12-19
- [3] Cuzick et al. (2006). Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer.* 119(5):1095-1101
- [4] Hansel et al. (2014). A Promising DNA Methylation Signature for the Triage of High-Risk Human Papillomavirus DNA-Positive Women. *PLOS ONE.* Volume 9, Issue 3, e91905
- [5] Schmitz et al. (2017). Performance of a methylation specific real-time PCR assay as a triage test for HPV-positive women. *Clinical Epigenetics.* 9:118
- [6] Schmitz et al. (2018). Performance of a DNA methylation marker panel using liquid-based cervical scrapes to detect cervical cancer and its precancerous stages. *BMC Cancer.* 18:1197
- [7] International Agency for Research on Cancer (2008). European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening – Second edition



## 15. PRÁVNÍ ODPOVĚDNOST

GynTect® Kit se smí používat pouze v souladu s jejím určeným účelem. Společnost oncgnostics GmbH nepřebírá odpovědnost za žádné jiné použití (např. nedodržení tohoto návodu k obsluze a nesprávné použití) a případné škody z toho vyplývající.

## 16. DOTAZY A PROBLÉMY

V případě dotazů a problémů s produktem se obraťte na příslušnou kontaktní osobu společnosti oncgnostics GmbH.

Naše technická podpora je vám k dispozici od pondělí do pátku mezi 8.00 a 16.00 hod. na následujícím čísle: **+49 (0) 3641 5548500**.

Mimo tuto dobu nás můžete kontaktovat na adrese **gyntect@oncgnostics.com**.

### oncgnostics GmbH

Löbstedter Straße 41

07749 Jena, Německo

Vedoucí: Dr. Alfred Hansel, Dr. Martina Schmitz

Pokud během zpracování cervikálních vzorků, provedení PCR, analýzy dat nebo při selhání celého stanovení GynTect® kvůli neplatnosti některé kontroly nastane některá z dále uvedených chyb, postupujte podle uvedených pokynů.

*Tabulka 21 Řešení potíží*

Problém a příčina	Poznámky a doporučení
<b>ODSTŘEDĚNÍ</b> Nedisponujete odstředivkou na PCR stripy/destičky	Setřepejte 8jamkový strip důrazným pohybem zápěstí tak, aby se veškerá tekutina shromáždila na dně jamek. Na vnitřku víčka nesmí ulpívat žádné kapičky; postup podle potřeby opakujte.
<b>NEPLATNÉ DENATURAČNÍ TEPLoty</b> GynTect® Strip byl v PCR systému umístěn obráceně o 180°.  Amplifikační a denaturační křivky jsou viditelné, ale teploty denaturace se podstatně liší od požadavků uvedených v návodu.	Teplota denaturace na pozici B by měla odpovídat teplotě na pozici G. Jamky A a B vykazují amplifikaci u všech GynTect® Strips kromě negativní kontroly. Vzorky lze analyzovat.  Kontaktujte společnost oncgnostics GmbH.

## ŽÁDNÝ NEBO NEPLATNÝ VÝSLEDEK PCR

Hodnota Cp markeru IDS-M je nad cílovou hodnotou.

Opakujte stanovení u daného vzorku pomocí nové soupravy GynTect®.

Opakujte stanovení u daného vzorku pomocí nové soupravy GynTect® s případným použitím většího objemu vzorku (2–3 ml). Pokud bude výsledek markerů i nadále negativní, daný vzorek pacientky nelze analyzovat.

Překročení cílové hodnoty pro GynTect® pozitivní kontrolu a/nebo GynTect® negativní kontrolu.

















Opakujte GynTect® pro všechny vzorky s naplněnými eluáty vzorků (ad 80 µl vody GynTect®).

## 17. DALŠÍ POZNÁMKY

Regulační oznámení zákazníkům v Evropské unii: Vezměte prosím na vědomí, že jste povinni oznámit příslušnému úřadu a společnosti oncgnostics GmbH všechny závažné incidenty, ke kterým dojde v souvislosti s výrobkem.

Aktuální verze bezpečnostního listu pro tento výrobek je dostupná ke stažení na webových stránkách (<http://www.oncgnostics.com/en/downloadcenter/>), nebo si ji můžete vyžádat e-mailem na adrese [gyntect@oncgnostics.com](mailto:gyntect@oncgnostics.com).

## 18. VÝZNAM SYMBOLŮ

Symbol	Význam	Symbol	Význam
	Mastermix		Teplotní omezení
	PCR stripy		Datum použitelnosti
	Víčka		Postačuje pro <n> testů
	Pozitivní kontrola		Výrobce
	Voda		Viz návod k použití
	<i>in vitro</i> diagnostikum		Skladujte v temnu
	Číslo šarže		Nepoužívejte opakovaně
	Katalogové číslo		Označení CE

## 19. SEZNAM ZMĚN

Předchozí verze (Datum vydání)	Změny
3.5 (květen 2022)	<ul style="list-style-type: none"><li>– Změna uspořádání, došlo ke změně umístění kapitol v návodu k použití</li><li>– Kapitola 11.2 Odběr vzorků<ul style="list-style-type: none"><li>○ Upraveny podmínky uchovávání cervikálních vzorků</li></ul></li><li>– Kapitola 11.5.2 Provádění PCR na cobas z 480 Analyzer<ul style="list-style-type: none"><li>○ Fixní pozice PC (řádek 11) a NTC (řádek 12)</li><li>○ Odstraněny snímky obrazovky</li></ul></li><li>– Přidána kapitola 11.5.3 Provádění PCR na CFX96 Real-Time PCR Detection System</li><li>– Byly přidány následující kapitoly:<ul style="list-style-type: none"><li>○ Kapitola 5 Referenční materiály</li><li>○ Kapitola 13 Meze tohoto postupu</li><li>○ Kapitola 14 Literatura</li><li>○ Kapitola 15 Právní odpovědnost</li><li>○ Kapitola 17 Další poznámky</li><li>○ Kapitola 19 Seznam změn</li></ul></li></ul>

## 20. ZKRÁCENÝ PROTOKOL

V této části uvádíme šablonu zkráceného protokolu ve formě kontrolního seznamu.

Před jeho použitím si přečtěte veškeré pokyny včetně všech poznámek a tipů v kapitole 11.

Hydrogensířičitanová souprava není součástí GynTect® Kit. Ošetření vzorků hydrogensířičitanem musí být provedeno pomocí soupravy EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10).

## PŘÍPRAVA VZORKU

- Vzorek pacientky promíchejte na vířivé třepačce po 5 s při maximální rychlosti a přeneste 1 ml média do 1,5 ml zkumavky.
- Odstřeďte vzorek po 5 min při 10 000 g.
- Odstraňte a zlikvidujte 900 µl supernatantu nad peletou.

## OŠETŘENÍ VZORKŮ HYDROGENSIŘIČITANEM

- Připravte pufrы ze soupravy EpiTect® Fast Bisulfite Kit podle Tabulky a.

*Tabulka a Složení pufru pro soupravu EpiTect® Fast Bisulfite Kit (Qiagen)*

Pufr	Přidat ethanol
Buffer BL *	–
Buffer BW	30 ml ethanolu (96–100 %)
Buffer BD	27 ml ethanolu (96–100 %)

\* nepřidávejte *Carrier RNA*, kontrola kvality

- Připravte reakci podle Tabulky b v 0,5 ml zkumavce, promíchejte na vířivé třepačce a odstřeďte.

*Tabulka b Reakce s hydrogensiričitanem*

Látka	Na reakci
Bisulfite Solution*	85 µl
DNA Protect Buffer	15 µl
Resuspendovaný vzorek	40 µl
Celkový objem na reakci	140 µl

\* Kontrola kvality

- Konverze pomocí termocykleru, zkontrolujte teplotní profil podle Tabulka 7.
- Vzorky promíchejte na vířivé třepačce a krátce odstřeďte.
- Do MinElute® Spin Column přidejte **310 µl Buffer BL**.
- Přidejte vzorek a promíchejte 5x pipetováním.
- Přidejte **250 µl ethanolu** (96–100 %) a 5x promíchejte převrácením kolonky na čepu.
- Odstřeďte kolonku po 30 s při 18 000 g, a poté zlikvidujte proteklou kapalinu.
- Přidejte **200 µl Buffer BW** a odstřeďte kolonku po 30 s při 18 000 g.
- Přidejte **200 µl Buffer BD** a inkubujte při pokojové teplotě po 15 min.
- Odstřeďte kolonku po 30 s při 18 000 g.
- Přidejte **200 µl Buffer BW** a odstřeďte kolonku po 30 s při 18 000 g; zlikvidujte proteklou kapalinu.
- Přidejte **400 µl Buffer BW** a odstřeďte kolonku po 30 s při 18 000 g.
- Přidejte **200 µl ethanolu** (96–100 %) a odstřeďte kolonku po 30 s při 18 000 g.

- Kolonku vložte do nové 2ml sběrné zkumavky a odstředíte po 60 s při 18 000 g.
- Umístěte kolonku do 1,5ml zkumavky, přidejte **20 µl vody** a nechte inkubovat po 60 s při pokojové teplotě.
- Odstředíte kolonku po 60 s při 8000 g.
- Možnost přerušení práce:* v tomto bodě lze pracovní postup přerušit a vzorky uložit.

### **PŘÍPRAVA A PIPETOVÁNÍ PCR REAKCE**

- Ke každému vzorku přidejte **70 µl GynTect® Water**, promíchejte na vířivé třepačce a krátce odstředíte.
- Promíchejte **GynTect® Mastermix** na vířivé třepačce a krátce odstředíte.
- Odstraňte barevná víčka ze **GynTect® Strips**, které budete používat.
- Do každé z reakčních jamek přidejte **10 µl GynTect® Mastermix**.
- Do každé z osmi jamek na odpovídajících **GynTect® Strip** přidejte **10 µl vzorku** nebo **GynTect® Positive Control** nebo **GynTect® Water**.
- GynTect® Strips** uzavřete **GynTect® Caps**.
- GynTect® Strips** promíchejte na vířivé třepačce a krátce odstředíte.

### **PROVEDENÍ PCR**

- Spustíte přístroj PCR, spustíte software a vyberte šablonu (GynTect).
- Zadejte název PCR měření a rozložení vzorku na destičce a zkontrolujte teplotní profil.
- Uložte měření PCR.
- Založte do přístroje **GynTect® Strips** a spustíte měření PCR.
- Po dokončení PCR provedte nastavení vyhodnocování a exportujte soubor .txt nebo .xlsx.

## ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ PCR

- Exportované soubory (.txt nebo .xlsx) otevřete ve vhodném tabulkovém procesoru.
- Zkontrolujte výsledky **pozitivní kontroly** a **negativní kontroly** u všech markerů.
- Zkontrolujte platnost a pozitivitu všech vzorků podle Tabulky c.

Tabulka c Kritéria platnosti a positivity

Marker	Hodnota Ct	Rozsah denaturačních teplot (cobas)	Rozsah denaturačních teplot (CFX)	$\Delta Ct$ (Marker x - IDS-M)	Kritéria pro
ASTN <sub>1</sub>	$\geq 20, \leq 42$	80 °C – 86 °C	78 °C – 86 °C	$\leq 8,00$	pozitivita
DLX <sub>1</sub>	$\geq 20, \leq 42$	79 °C – 85 °C	77 °C – 85 °C	$\leq 9,00$	
ITGA <sub>4</sub>	$\geq 20, \leq 42$	80 °C – 85 °C	78 °C – 85 °C	$\leq 9,00$	
RXFP <sub>3</sub>	$\geq 20, \leq 42$	80 °C – 85 °C	78 °C – 85 °C	$\leq 9,00$	
SOX <sub>17</sub>	$\geq 20, \leq 42$	81 °C – 87 °C	79 °C – 87 °C	$\leq 9,00$	
ZNF671	$\geq 20, \leq 42$	80 °C – 87 °C	78 °C – 87 °C	$\leq 10,00$	
ACHE	$\geq 20, \leq 42$	78 °C – 83 °C	76 °C – 83 °C	-	platnost
IDS-M	$\geq 20, \leq 32$	78 °C – 88 °C	76 °C – 88 °C	-	

- Proveďte posouzení **výsledků stanovení GynTect®**.

Tabulka d Hodnoty pro markery GynTect®

Marker	Hodnota při pozitivním markeru	Hodnota při negativním markeru
ASTN <sub>1</sub>	2	0
DLX <sub>1</sub>	1	0
ITGA <sub>4</sub>	2	0
RXFP <sub>3</sub>	2	0
SOX <sub>17</sub>	2	0
ZNF671	6	0

Součet všech hodnot  $\geq 6$   
**→ GynTect® pozitivní**

Pozitivní výsledek testu GynTect® koreluje s přítomností cervikální intraepiteliální neoplazie nebo karcinomu děložního čípku. Výsledek stanovení GynTect® se nemá používat ke konečnému rozhodnutí o léčbě; je třeba jej vyhodnotit společně s ostatními klinickými nálezy.